

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 154**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17 (2015.01)

C07K 14/725 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2020 PCT/EP2020/067380**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2020 WO20254694**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2020 E 20733317 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024 EP 3986428**

54 Título: **Vector todo en uno para CAR y molécula efectora terapéutica**

30 Prioridad:

21.06.2019 EP 19181837

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2024

73 Titular/es:

**MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER
(100.0%)
Carl-Neuberg-Strasse 1
30625 Hannover, DE**

72 Inventor/es:

**SCHAMBACH, AXEL, PROF., DR.;
ZIMMERMANN, KATHARINA, DR.;
ABKEN, HINRICH, PROF., DR. y
KÜHLE, JOHANNES, DR.**

74 Agente/Representante:

ESPIELL GÓMEZ, Ignacio

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 986 154 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN**Vector todo en uno para CAR y molécula efectora terapéutica**

5 La presente invención se refiere a un vector para la expresión constitutiva de una segunda proteína y la expresión inducible de al menos una primera molécula, también denominada como una primera proteína, en células de mamífero. Generalmente, el vector contiene una expresión casete para la expresión constitutiva de la segunda proteína y una expresión casete para la expresión inducible de la primera molécula, en donde la segunda proteína es una molécula receptora, por ejemplo, un receptor, por ejemplo, un CAR o un TCR, capaz de
10 unirse a un antígeno afín, y la primera molécula es una molécula efectora y la expresión de la primera molécula es inducida mediante la unión de la segunda proteína a su antígeno afín. El vector puede usarse, preferiblemente, para la introducción y expresión en células inmunitarias, en particular linfocitos, células NK y macrófagos. La segunda proteína y la primera molécula pueden ser proteínas clínicamente relevantes. En consecuencia, el vector es adecuado para usar en la terapia, por ejemplo, para usar en terapia inmunológica, especialmente en el tratamiento del cáncer, incluyendo la leucemia, el linfoma y los tumores sólidos, o para usar en inmunomodulación, por ejemplo, para usar en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o para proporcionar tolerancia inmunitaria, por ejemplo, tolerancia inmunitaria para un antígeno afín. En una modalidad específica de la invención, el vector comprende un casete de expresión constitutiva que codifica como la segunda proteína un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR) y un casete de
20 expresión inducible que codifica como la primera molécula una molécula terapéutica, también denominada molécula efectora o módulo efector, como puede ser, por ejemplo, un péptido, proteína o ARN, la cual puede seleccionarse de los ARNhc, miARN, ARNinc y ARNgu. La molécula terapéutica puede tener actividad estimulante sobre la respuesta inmunitaria, por ejemplo, la molécula efectora puede ser una citocina, una linfocina, una quimiocina u otro factor tisular. Ejemplos de moléculas efectoras son IL-18, IL-12, IL-12 que tiene una secuencia modificada, IL-15, IL15 que tiene una secuencia modificada, IL21, IL2, TGF-beta, IL10, IL35, TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral) y/o IFN-γ. El vector puede ser un vector viral que comprende LTR o LTR SIN flanqueantes, o repeticiones terminales invertidas (ITR) flanqueantes. Preferiblemente, el vector es adaptado para su integración en el genoma de una célula inmunitaria. Generalmente en la presente descripción, un antígeno afín también es denominado antígeno diana.

30 En una modalidad preferida de la invención, el vector viral es autoinactivante (SIN) después de la integración en el ADN de una célula receptora. El vector tiene las ventajas de que el casete de expresión constitutiva para la segunda proteína, el cual es, preferentemente, un CAR o un TCR, y el casete de expresión inducible para la primera molécula, el cual también está relacionado con una molécula efectora, en la ausencia de unión del antígeno al CAR o al TCR no se influyen entre sí, es decir, el alelo inducible solo tiene una actividad de fondo muy baja y ambos casetes están presentes en un único vector, lo que requiere solo una única modificación genética para generar células inmunitarias manipuladas genéticamente. En la presencia del antígeno que se une al CAR o al TCR, respectivamente, se produce la primera molécula, es decir, como una respuesta específica del antígeno mediada por la transducción de señales del CAR o del TCR.

40

Estado de la técnica

Chmielewski y Abken, Cell Reports 3205-3219 (2017), describen células T manipuladas genéticamente que, por un lado, contienen una construcción de ácido nucleico que expresa un CAR que puede unirse a su antígeno diana a través de su región específica de fragmento variable de cadena única (scFv) y, por otro lado, contienen adicionalmente una segunda construcción de ácido nucleico para la citocina IL-18 que es inducible después del acoplamiento del CAR o de forma constitutiva. La construcción del vector de IL-18 inducible adicional consiste en

ES 2 986 154 T3

seis elementos NFAT seguidos de un promotor mínimo de IL-2. IL-18 se expresa solamente después del reconocimiento del antígeno del CAR. Además, también describen una construcción del vector de IL-18 que expresa constitutivamente IL-18 independientemente del reconocimiento del antígeno y del acoplamiento de la construcción CAR.

5

Chmielewski y Abken, Cancer Immunol Immunother 1269-1277 (2012) describen la expresión de IL-12 bajo el control de un promotor derivado de NFAT después de la unión de un CAR a su antígeno, el CAR que contiene CD3 ζ como un dominio de señalización intracelular. Kailayangiri y otros, Oncoimmunology 2017, vol. 6, núm. 1, e1250050, describen la construcción de un CAR que es específico para el antígeno GD2.

10

La patente WO 2019/051424 A2 describe construcciones genéticas las cuales son transposones para la expresión constitutiva de un receptor de antígeno quimérico (CAR) y la expresión inducible de GFP o resp. del Factor IX de la coagulación sanguínea.

15

La patente WO 2018/132494 A1 describe construcciones de vectores para la expresión inducible de genes, en donde un polipéptido de unión al ADN y un polipéptido transactivador están conectado por medio de un enlazador.

20

La patente WO 2019/006468 A1 describe construcciones de ADN para la expresión constitutiva de un CAR y la expresión inducible de una enzima que escinde un profármaco, por ejemplo, CPG2 o beta-lactamasa.

La patente US 2019/0112380 A1 describe células inmunitarias manipuladas genéticamente que expresan receptores de antígenos quiméricos y proteína de señalización K13-vFLIP para el tratamiento del cáncer.

25

La patente WO 2017/186121 A1 describe células de respuesta inmunitaria que expresan constitutivamente un receptor de antígeno quimérico y que expresan de manera inducible interferón gamma exógeno.

Objetivo de la invención

30

El objetivo de la invención es proporcionar un vector mejorado alternativo, especialmente un vector que contiene tanto un casete de expresión CAR como un módulo efector inducible adicional el cual contiene o es un casete de expresión que codifica ARN o una proteína. Esto permitirá una expresión aumentada específica de la molécula efectora después del reconocimiento del CAR del antígeno afín. El efector puede ser, opcionalmente, IL-18, IL-12 y/u otra citocina que puede, por ejemplo, ayudar a modificar específicamente el microambiente tumoral y reclutar otras células inmunitarias. Preferiblemente, el vector será adecuado para inmunomodulación, por ejemplo, para la inducción de tolerancia o tratamiento de autoinmunidad mediante, por ejemplo, módulos efectores inmunomoduladores tales como IL-10 o TGF-beta. Preferiblemente, el vector viral permitirá la producción de un título elevado de partículas virales el cual es adecuado para aplicaciones clínicas. Con mayor preferencia, la invención proporcionará células T transducidas por el vector, opcionalmente otras células inmunitarias transducidas por el vector, para usar en el tratamiento de tumores o de células infectadas viralmente. Preferentemente, la expresión de citocinas inducibles debe estar estrechamente ligada a la expresión de CAR y no será activa sin ninguna presencia del antígeno diana.

35

40

Descripción de la invención

45

La invención logra el objetivo mediante las características de las reivindicaciones, especialmente mediante una construcción de ácido nucleico, también denominada generalmente en la presente descripción como un vector o

ES 2 986 154 T3

vector viral, y mediante células inmunitarias que contienen la construcción de ácido nucleico, especialmente para usar en terapia inmunológica, por ejemplo para usar en el tratamiento del cáncer, o para usar en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, o para usar en el tratamiento de GvH o HvG. La construcción de ácido nucleico comprende una segunda expresión casete para la expresión constitutiva de un CAR o un TCR, cuya
5 unión a su antígeno diana o afín resulta en la señalización e induce la expresión de una molécula efectora a partir de un primer casete de expresión, el cual está contenido en la misma construcción de ácido nucleico, y cuyo primer casete de expresión codifica la molécula efectora bajo el control de un promotor inducible mediante la señalización del CAR o del TCR. En este sentido, la segunda molécula es una molécula receptora para un antígeno afín y la primera molécula es una molécula efectora, y la construcción de ácido nucleico se configura
10 para expresar la molécula efectora después de la señalización mediante la unión del CAR o del TCR a su antígeno afín. La construcción de ácido nucleico contiene preferiblemente elementos de integración, por ejemplo, elementos LTR virales y el vector es, por ejemplo, un vector lentiviral, un (α)-retroviral alfa o un (γ)-retroviral gamma. Además, los elementos de integración pueden ser sitios de reconocimiento de transposasa. La construcción de ácido nucleico puede, opcionalmente, unirse operativamente a un promotor que controla la
15 transcripción para usar en la producción de partículas virales que contienen el vector viral, en donde la producción es en células eucariotas hospedadoras. La construcción de ácido nucleico, o vector, comprende o consiste en al menos un casete de expresión para una primera molécula, también denominada en la presente descripción como una molécula efectora, y al menos un casete de expresión para una segunda proteína, representada generalmente en la presente descripción por un CAR, cuyos casetes de expresión se disponen
20 entre una LTR 5' y una LTR SIN 3'. En modalidades, en las cuales el al menos una expresión de casete para una molécula efectora y el al menos una expresión de casete para un CAR están dispuestas en la misma hebra de una construcción de ácido nucleico, es decir, que forman un vector, con mayor preferencia en una hebra común de ARN o ADN, la expresión de casete para una molécula efectora también es denominada como una primera casete de expresión, la cual se dispone en el 5' con respecto a la casete de expresión para el CAR, la cual
25 también se denomina como un segundo casete de expresión. Se descubrió que esta arquitectura del vector es muy importante, porque otra disposición de estos casetes de expresión resulta en una lectura completa y puede resultar en una expresión de fondo no deseada de la molécula efectora. Una disposición de ambos casetes en orientación antisentido conduce a una interferencia de ARN que disminuye los títulos del vector. Se descubrió además que se prefiere la orientación del promotor del primer casete de expresión y de la secuencia codificante
30 de la molécula efectora en orientación sentido, es decir, orientación sentido de la primera expresión casete y orientación sentido de expresión del segundo casete. En consecuencia, se prefiere que el primer casete de expresión y el segundo casete de expresión estén en la misma hebra, ADN o ARN, y que el primer casete de expresión esté en el 5' con respecto al segundo casete de expresión. Por el contrario, con una alta inducción para la orientación sentido de ambos casetes de expresión, la orientación antisentido del primer casete de
35 expresión resultó en una expresión disminuida del casete de expresión que codifica el CAR en la orientación sentido. En consecuencia, es preferible que el primer casete de expresión se disponga directamente adyacente al segundo casete de expresión, en donde ambos casetes de expresión estén dispuestos en una hebra de ácido nucleico, de manera que ambos casetes de expresión estén dispuestos en la misma dirección de la transcripción, es decir, en sentido orientado. Con mayor preferencia, una señal de empaque (elemento Ψ) está dispuesta entre
40 la LTR SIN 5' y el primer promotor del primer casete de expresión.

Después de la integración de la construcción de ácido nucleico, por ejemplo en una modalidad de un vector viral, en el genoma de una célula inmunitaria, por ejemplo mediante transducción con partículas virales que contienen el vector, la LTR (repetición terminal larga) la cual está dispuesta en el 5' de el al menos un primer casete de
45 expresión y el al menos un segundo casete de expresión, son reemplazados por una copia de la LTR SIN (LTR autoinactivante) que está dispuesta en el 3' con respecto al primer y segundo de expresión casetes, por ejemplo en el extremo 3' del vector, lo que resulta en una copia del vector integrada en el genoma y no replicativa. En la

ES 2 986 154 T3

construcción de ácido nucleico, el primer y el segundo casetes de expresión pueden estar dispuestos entre dos elementos LTR SIN. En consecuencia, el vector puede contener dos LTR SIN, flanqueantes del primer y del segundo casetes de expresión.

5 El vector viral puede ser un vector SIN retroviral alfa, un vector SIN retroviral gamma o un vector SIN lentiviral.

Preferiblemente, una señal de empaque viral (elemento Ψ) está dispuesta entre al menos uno de los LTR o de los sitios de reconocimiento de transposasa y un casete de expresión, más preferiblemente, un elemento Ψ dispuesto entre una LTR 5', respectivamente un sitio de reconocimiento de transposasa 5' y el casete de expresión adyacente, el cual preferiblemente es el primer casete de expresión.

La disposición de los casetes de expresión en una hebra, ADN o ARN, con el primer casete de expresión en el 5' con respecto al segundo casete de expresión en el vector tiene la ventaja de ser una construcción de ácido nucleico que contiene integralmente y es suficiente para proporcionar una célula inmunitaria con ambas un CAR o TCR dirigido contra un antígeno diana, y con un casete de expresión que codifica una molécula efectora, en donde la expresión de la molécula efectora solo es inducible mediante la unión del CAR o TCR a su antígeno diana, preferiblemente con niveles significativamente más bajos o preferiblemente ninguna expresión del efector en la ausencia del antígeno diana para el CAR o TCR. Esta configuración Todo en Uno del vector permite procesos de producción clínicamente traducibles simplificados que comprenden la alteración, por ejemplo, el intercambio del dominio de unión al antígeno del CAR o TCR, y la producción solo de una construcción de vector, y proporciona, por lo tanto, una ventaja en comparación con las combinaciones actuales de vectores, en los cuales se usa una construcción de vector separada para la expresión de CAR y se usa una segunda construcción de vector para la expresión de un módulo efector. El proceso produce células inmunitarias para usar en el tratamiento de células que expresan el antígeno diana del CAR o TCR, respectivamente. Las células que expresan el antígeno diana pueden ser, por ejemplo, células tumorales que expresan un antígeno tumoral como el antígeno diana, células inmunitarias que causan una enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo células inmunitarias que expresan una molécula de MHC como el antígeno diana, cuya molécula de MHC reconoce un autoantígeno, o para usar en el tratamiento de la enfermedad HvG en pacientes trasplantados, en donde el antígeno diana es, por ejemplo, una molécula de MHC del injerto. El proceso puede ser un proceso in vitro, mediante el uso de células inmunitarias autólogas que se originan en el último paciente a tratar, y el proceso puede comprender una etapa de controlar células inmunitarias en las cuales se ha introducido una construcción de ácido nucleico de la invención, y seleccionar células inmunitarias las cuales contienen la construcción de ácido nucleico de la invención, preferiblemente, mediante la selección de células inmunitarias las cuales contienen la construcción de ácido nucleico de la invención y mediante la exclusión de las células que tienen marcadores tumorales.

Además, las partículas virales que contienen la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención, también denominada vector Todo en Uno, que contienen o consisten tanto en el primer casete de expresión como en el segundo casete de expresión, preferiblemente flanqueadas por sitios LTR, sitios LTR y SIN-LTR, son producidos con títulos altos en una célula de producción. Para la producción de partículas virales que contienen el vector, se usa, preferiblemente, un sistema de empaque dividido, el cual, por ejemplo, comprende o consiste en el vector, un primer plásmido auxiliar que expresa las proteínas estructurales virales y las enzimas de replicación (gag-pol) y un segundo plásmido auxiliar para la expresión de la proteína de la envoltura retroviral (env). Para la producción de vectores lentivirales, se expresa una proteína rev adicional que se une a los elementos de respuesta Rev (RRE) y facilita el empaque y la exportación de transcriptos. Para la producción, especialmente de construcciones de ácido nucleico de la invención las cuales son vectores virales, son preferidas células cultivadas de mamíferos humanas o no humanas. Para construcciones de ácido nucleico que

ES 2 986 154 T3

contienen sitios de reconocimiento de transposasa, por ejemplo ITR, que flanquean el primer casete de expresión y el segundo casete de expresión, la construcción de ácido nucleico puede estar en combinación con transposasa, por ejemplo codificada en una sección de ácido nucleico que se dispone en una sección que no está flanqueada por los sitios de reconocimiento de transposasa, por ejemplo ITR, o la transposasa puede ser proporcionada como un plásmido de adición. La región que codifica la transposasa es preferentemente un casete de expresión para transposasa, que posee un promotor en el 5' con respecto a la región que codifica la transposasa y una señal de poliadenilación en el 3' con respecto a la región que codifica la transposasa. Para la manipulación genética de una célula inmunitaria, tanto la construcción de ácido nucleico que contiene el primer casete de expresión como el segundo casete de expresión y la región que codifica la transposasa se transfectan en la célula inmunitaria.

Además, el vector tiene la ventaja de que una vez que el antígeno diana está presente, la unión del CAR a su antígeno diana resulta directamente en la inducción de la expresión de la molécula efectora a partir del primer casete de expresión, mientras que en la ausencia del antígeno diana se produce una expresión significativamente menor o nula de la molécula efectora. Esto muestra que el vector se configura para expresar la molécula efectora codificada por el primer casete de expresión esencialmente solo en respuesta a la presencia del antígeno diana, para el cual el CAR es específico. Este comportamiento del vector es altamente conveniente, porque la molécula efectora solo se produce por células, preferiblemente células inmunitarias, que contienen el vector en la presencia, es decir, en contacto con el antígeno diana, y por tanto el efector es producido solo en los alrededores de, por ejemplo, células que portan el antígeno diana. En consecuencia, el vector, respectivamente las células inmunitarias que contienen el vector, son adecuados para usar en el tratamiento médico de células que expresan el antígeno diana, y especialmente de tumores sólidos, de enfermedades autoinmunitarias, o para proporcionar tolerancia, mediante la generación de una respuesta inmunitaria celular dirigida contra células que portan el antígeno diana en combinación con la secreción de una molécula efectora solo en los alrededores de las células que portan el antígeno diana. Para usar en el tratamiento de un tumor, preferiblemente de un tumor sólido, el antígeno diana puede ser un antígeno tumoral, y el CAR es específico para el antígeno tumoral. Para usar en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, el antígeno diana puede ser el antígeno contra el cual se dirige la enfermedad autoinmunitaria, y el CAR es específico para el antígeno diana.

Debido a la secreción localizada de citocinas solo en la presencia del antígeno diana, por ejemplo en el sitio de la inflamación, por ejemplo, IL-12 o IL-18 como molécula efectora, este vector tiene la ventaja de moldear el microambiente tumoral mediante el reclutamiento de otras células inmunitarias por ejemplo, macrófagos, células dendríticas o células NK y, por lo tanto, mejorar las respuestas inmunitarias proinflamatorias y antitumorales. En base a la arquitectura modular del vector, también es posible expresar otras moléculas efectoras, por ejemplo, otras citocinas, por ejemplo, IL-15, que son conocidas por prolongar la supervivencia y persistencia de las células inmunitarias y, por tanto, afectan directamente a la respuesta inmunitaria. Con respecto a esto, el vector puede ser usado para influir en la respuesta inmunitaria de una manera antiinflamatoria, que se expresa como molécula efectora, por ejemplo, IL10 y/o TGF-beta, por ejemplo, para usar en el tratamiento de la enfermedad GvH o en la enfermedad HvG con el fin prolongar la supervivencia del trasplante, o para usar en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

Como las células inmunitarias que contienen el vector son configuradas para secretar el efector codificado por el primer casete de expresión solamente en la presencia del antígeno diana del CAR, se descubrió que esencialmente no se produce secreción sistémica de la molécula efectora, lo que evita efectos secundarios sistémicos adversos del efector. En detalle, el CAR que se expresa constitutivamente del segundo casete de expresión activa la expresión de la molécula efectora codificada por el primer casete de expresión inducible a través de su dominio efector intracitoplasmático, y por lo tanto activa la secreción de la molécula efectora

ES 2 986 154 T3

inmunitaria directamente en el tejido que porta el antígeno diana reconocido por el CAR, por ejemplo dentro del tumor, y debido a esta expresión localizada de moléculas efectoras, las cuales por ejemplo inducen la inflamación, se minimizan o evitan posibles efectos secundarios sistémicos adversos. Este vínculo funcional directo entre el CAR que se une a su antígeno diana y la expresión de la molécula efectora proporciona un control mejorado tanto de las células diana modificadas genéticamente como de la secreción inducible de la molécula efectora y representa una ventaja adicional del sistema de vector Todo en Uno. Además, el uso de un solo vector reduce el riesgo de mutagénesis por inserción y de oncogénesis cooperativa. Finalmente, una reducción de las etapas para la manipulación genética de células inmunitarias a una transducción con un solo vector de partículas virales Todo en Uno es más práctica y, por ejemplo, permite el uso de procesos clínicos para producir células T CAR/TCR mejoradas con efectores, células NK y otras células inmunitarias.

La molécula efectora puede ser seleccionada, por ejemplo, de IL-12, IL-15, IL-18, IL-10, TGF-beta, IL-2, IL-21 y IFN- γ . Preferiblemente, IL-12 está codificada por la SEQ ID NO: 4, la cual se ha encontrado que en células inmunitarias humanas sea expresada más eficientemente que la secuencia codificante de tipo silvestre, y la IL-18 es codificada preferentemente por la SEQ ID NO: 6, la cual se ha encontrado que en células inmunitarias humanas es expresada más eficientemente que la secuencia codificante de tipo silvestre. Para IL12, preferiblemente las cadenas son fusionadas directamente entre sí.

El vector puede estar contenido en diversas células inmunitarias, por ejemplo, células T, preferiblemente células T primarias (que incluye también células T reguladoras primarias), células NK primarias, células NKT primarias, macrófagos, células NK92 y células dendríticas. La célula inmunitaria que contiene el vector, respectivamente la célula inmunitaria la cual es manipulada genéticamente para contener el vector, puede ser una célula T, una célula NKT primaria, una célula NK92, un macrófago o una célula dendrítica, preferiblemente una célula T primaria. Preferiblemente, para que el primer promotor sea el promotor NF κ BenhSyn, la célula inmunitaria es una célula NK primaria o una célula NK92. Más detallado, la célula inmunitaria se origina en el paciente, que es el receptor posterior de la célula inmunitaria que contiene el vector.

Alternativamente, las células inmunitarias con expresión de MHC y/o TCR regulada negativamente, las cuales pueden obtenerse, por ejemplo, como células prefabricadas, pueden manipularse genéticamente para contener el vector.

En modalidades, en las cuales la célula inmunitaria es una célula NK, especialmente cuando el vector es un vector retroviral alfa o lentiviral, el primer promotor es preferiblemente el promotor NF κ BenhSyn como un promotor más fuerte, o el primer promotor es el promotor de NFAT como un promotor más débil.

El CAR, desde el extremo N al extremo C, generalmente comprende o consiste en un dominio de unión a antígeno - opcionalmente una bisagra - dominio transmembrana - dominio efector intracitoplasmático, en donde el dominio de unión es un dominio de unión a antígeno diana, por ejemplo, un scFv, un nanocuerpo, una darpina, un ligando o la porción extracelular de un receptor de células T o de un receptor de células B. El dominio efector intracitoplasmático comprende o consiste preferiblemente en el dominio CD3zeta (CD3 ζ) o, por ejemplo, la cadena g de Fc ϵ RI, con o sin al menos un dominio coestimulante, por ejemplo, es seleccionada del dominio CD28, el dominio 41BB y el dominio CD27, preferiblemente el dominio efector intracitoplasmático desde el extremo N al extremo C consiste en el dominio CD3 ζ y un dominio CD28 adyacente. En la presencia de la unión del antígeno diana al dominio de unión, al menos una porción del dominio efector intracitoplasmático, por ejemplo, el dominio CD3 ζ , se dimeriza. El dominio coestimulante puede mejorar el efecto activador del CAR cuando se une al antígeno diana. En una alternativa a CD3 ζ , por ejemplo, para células NK, el dominio efector intracitoplasmático del CAR puede ser el dominio efector intracelular de DAP12 o DAP10. En las modalidades

ES 2 986 154 T3

preferidas, el CAR, la cual puede ser un receptor de células T (TCR), como su dominio de señalización intracelular comprende un dominio CD3 ζ , el cual directamente o mediado o asistido por factores de transcripción de células eucariotas, activa promotores que contienen un elemento NFAT o un elemento NF κ BenhSyn, especialmente un promotor de una de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, y la SEQ ID NO: 31.

5

Para la producción de partículas virales que contienen la construcción de ácido nucleico que contiene o que consisten tanto en el primer casete de expresión como en el segundo casete de expresión, en una célula de producción la construcción de ácido nucleico está preferiblemente bajo el control de un promotor seleccionado del grupo de promotor de Citomegalovirus (CMV) (SEQ ID NO: 12), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) (SEQ ID NO: 13), o el promotor de U3 del HIV (SEQ ID NO: 14). En el caso de vectores retrovirales gamma también pueden ser usados promotores derivados de MLV (por ejemplo, el promotor de SFFV o MPSV). El vector tiene la ventaja para la aplicación clínica de que puede ser producido con títulos elevados que son suficientes para la generación de células T genéticamente modificadas y otras células inmunitarias, tales por ejemplo, células NK y células NK T, en condiciones de buenas prácticas de fabricación (GMP). Se descubrió que mediante el intercambio del promotor de RSV por el promotor de CMV dentro de la región LTR 5', el título de partículas virales que contienen el vector en las células productoras fue aumentado hasta 10 veces.

10
15

De acuerdo con la invención, el primer casete de expresión de 5' a 3' comprende o consiste en un primer promotor que contiene una caja TATA, por ejemplo, en el promotor mínimo de IL2 o elemento mejorado, una secuencia codificante que codifica la molécula efectora, y opcionalmente en el 3' adyacente a la secuencia codificante un terminador o preferiblemente está desprovisto de un terminador. Preferiblemente, estos elementos están dispuestos directamente adyacentes entre sí. El primer promotor es inducible por la célula hospedadora que contiene el vector y es inducida por NFAT (factor nuclear de células T activadas) y preferiblemente tiene la SEQ ID NO: 1, también denominado como promotor NFATenhSyn, porque ha mostrado una inducción mejorada, por ejemplo, porque efectúa una mayor expresión de la secuencia codificante que un promotor NFAT de tipo silvestre conocido, y es un elemento promotor sintético. Como una alternativa, el primer promotor puede tener la SEQ ID NO: 2 (NFATmIL2) y consiste en un promotor mínimo de IL2 que incluye una caja TATA y fusionado a seis elementos de respuesta a NFAT, o la SEQ ID NO: 3 (NF κ BenhSyn), donde los elementos de respuesta a NFAT fueron intercambiados por dos elementos de respuesta a NF κ B, o la SEQ ID NO: 31. Se descubrió que el primer promotor que tiene la

20

25

30

SEQ ID NO: 1 (NFATenhSyn)

(TGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTC
TTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGC
35 AAAGTGTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCATACA
GAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCTGCAGGAGACTCTAC

SEQ ID NO: 2 (NFATmIL2)

40

45

(GATATCGAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAA
TTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTT
TCATACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATA
CAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGG
AGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCGGACATTTTGACACC
CCCAATAATTTTCCAGAATTAACAGIATAAATTGCATCTCTTGTTCAGAGTTC
CCTATCACTCTCTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTG). or

ES 2 986 154 T3

- cuando el vector es integrado en el genoma de una célula inmunitaria. De manera similar, por ejemplo, se descubrió que el promotor de EF-1 alfa corto (EFS, SEQ ID NO: 11), cuando se dispone en el segundo casete de expresión, tampoco induce la transcripción desde el primer casete de expresión que codifica el efector. Por el contrario, con los promotores de PGK y EFS, el promotor de U3 del virus formador de focos del bazo (SFFV, SEQ ID NO: 10) cuando se usó como segundo promotor para el CAR mostró una mayor transactivación del primer casete de expresión. En consecuencia, se prefieren promotores con potencial de transactivación débil, tal como el promotor de PGK y el promotor de EFS, a un promotor fuerte con potencial de transactivación, por ejemplo, SFFV.
- 10 La invención se describe ahora con mayor detalle y con referencia a las figuras, en donde
- La figura 1 muestra una modalidad de la disposición de los elementos de un vector viral de acuerdo con la invención,
 - La figura 2 muestra una modalidad de la disposición de los elementos de un vector viral de acuerdo con la invención,
 - 15 - La figura 3 muestra los niveles de expresión de vectores en células T después de la estimulación específica de CAR,
 - La figura 4A muestra los resultados de la producción de partículas virales que contienen un vector de la invención,
 - 20 - La figura 4B muestra los niveles de expresión de un efector de células T que contienen el vector después de la estimulación específica de CAR,
 - La figura 4C muestra los resultados de citotoxicidad para las células inmunitarias (células T) que contienen el vector,
 - La figura 5 en A, C y E muestra representaciones esquemáticas de vectores, y en B, D y F muestra resultados de FACS para la expresión del efector a partir de vectores sin inducción, con inducción y con inducción inespecífica,
 - 25 - La figura 6A muestra la expresión del efector en células T transducidas con vectores retrovirales alfa Todo en Uno después de la estimulación específica de CAR, y
 - La figura 6B muestra una modalidad de la disposición de los elementos de un vector viral después del intercambio del elemento NFAT por el elemento NFκB,
 - 30 - La figura 6C muestra la comparación entre los promotores de NFATenhSyn y NFκBenhsyn en células NK92 transducidas con retrovirus alfa y su inducción efectora después de la estimulación específica de CAR,
 - La figura 7A muestra esquemáticamente dos modalidades de un vector viral de acuerdo con la invención que codifica hIL21 y hTRAIL, como moléculas efectoras, respectivamente,
 - 35 - La figura 7B muestra los niveles de secreción de hIL21 y la Figura 7C muestra los niveles de secreción de hTRAIL, resp., de células T primarias que contienen un vector que es mostrado en la figura 7A con o sin contacto con células de glioblastoma que expresan el antígeno diana para el CAR,
 - Las figuras 8A, 8B, 8C y 8E muestran gráficos de barras de la expresión de una molécula efectora representativa para diferentes primeros promotores de células inmunitarias que albergan el vector y estimuladas por la presencia del antígeno diana del CAR,
 - 40 - La figura 8D muestra los resultados de FACS para EGFP como una molécula efectora representativa bajo el control de diferentes primeros promotores sin (sin) y con estimulación por células que expresan el antígeno diana GD2 para el CAR específico de GD2.
- 45 En las figuras, el CAR ilustrativo, el cual es específico para GD2, también es denominado GD2CAR. La figura 1 y la figura 2 muestran esquemáticamente construcciones de ácido nucleico ilustrativos de un primer casete de expresión 1 y un segundo casete de expresión 2 de la invención entre una LTR 5' y una LTR SIN 3'. Como es

ES 2 986 154 T3

preferido generalmente, el primer casete de expresión 1 está dispuesto en el 5' del segundo casete de expresión 2, y tanto el primer como el segundo casetes de expresión 1, 2 están en la misma hebra de una construcción de ácido nucleico.

5 La figura 1 muestra dos modalidades, en las cuales el primer casete de expresión 1 consiste en un promotor de la SEQ ID NO: 1 (NFATenhsyn), una caja TATA de nucleótidos 202.208 de la SEQ ID NO: 1, y una secuencia codificante para el efector, representada por eGFP (EGFP) o una citocina (Citocina), y el segundo casete de expresión 2 consiste en el promotor de PGK (PGK), una secuencia codificante para un CAR que tiene un dominio de unión a antígeno (CAR de interés), y un WPRE (wPRE). En dos modalidades adicionales que se muestran en
10 la figura 2, el primer casete de expresión 1 consiste en el promotor NFATmIL2 (NFATmIL2) de la SEQ ID NO: 2 directamente unido por una secuencia codificante para el efector, ejemplificada por EGFP o una citocina (Citocina). El segundo casete de expresión 2 es el mismo que en las otras dos modalidades. Ni el primer casete de expresión 1, ni el segundo casete de expresión 2 contienen un terminador interno en el 3' de la secuencia codificante. Generalmente, la LTR3', más específicamente la región R con U5, puede servir como señal de
15 poliadenilación.

Ejemplo 1: Expresión del efector y de CAR a partir de vectores lentivirales

Como representativo de un efector, la secuencia codificante para eGFP (proteína fluorescente verde mejorada, EGFP) o la secuencia codificante para IL-12 (IL12) estaban contenidas en un primer casete de expresión bajo el control del promotor NFATenhsyn (NFATenhsyn) que tiene la SEQ ID NO: 1 o bajo el control del promotor NFATmIL2 que tiene la SEQ ID NO: 2, y el segundo casete de expresión, que se dispone en el 3' con respecto al primer casete de expresión, contiene un CAR específico de GD2 (GD2CAR) bajo el control del promotor de PGK (PGK, nucleótidos 5158..5673 de la SEQ ID NO: 8), seguido del WPRE (SEQ ID NO: 15, PRE). Un CAR
25 específico de GD2 (GD2CAR, por ejemplo, como se describió por enKailayangiri y otros, Oncoimmunology 2017) contenía, desde su extremo N hasta su extremo C, un dominio de unión a antígeno específico para el antígeno diana ilustrativo Gangliósido 2 (GD2), una bisagra, un dominio transmembrana, un dominio de señalización 4-1BB fusionado a un dominio CD3ζ. El primer y segundo casetes de expresión fueron flanqueados por una LTR 5' y una LTR SIN 3'.

30 El vector que codifica eGFP (EGFP) bajo el control del promotor NFATenhsyn es denominado pCCL.PPT.NFATenhsyn.EGFP.PGK.CAR.wPRE (SEQ ID NO: 8), en donde el CAR fue un CAR específico de GD2.

35 El vector el cual como alternativa al promotor NFATenhsyn en el primer casete de expresión, contenía el promotor que tiene la SEQ ID NO: 2 (NFATmIL2) en el 5' con respecto a la porción que codifica el efector (eGFP) se denominó pCCL.PPT.NFATmIL2.EGFP.PGK.CAR.wPRE (SEQ ID NO: 20), en donde el CAR era un CAR específico de GD2. Una construcción de vector retroviral alfa que tiene el promotor NFκBmIL2 en el primer casete de expresión está representado en la SEQ ID NO: 26.

40 Como un ejemplo adicional, se usó un vector que tiene los mismos elementos excepto por el primer casete de expresión que codifica IL-12 humana (IL12humana) en lugar de eGFP; este vector fue denominado pCCL.PPT.NFATenhsyn.humanIL12.PGK.CAR.wPRE (SEQ ID NO: 16) para el primer casete de expresión que contiene el promotor NFATenhsyn, en donde el CAR fue un CAR específico de GD2. Un vector conteniendo el
45 promotor NFATmIL2 de la SEQ ID NO: 2 para el primer casete de expresión fue denominado pCCL.PPT.NFATmIL2.humanIL12.PGK.CAR.wPRE (SEQ ID NO: 22), en donde el CAR era un CAR específico de GD2. Un vector que contiene el promotor NFκBmIL2 de la SEQ ID NO: 31 para el primer casete de expresión

ES 2 986 154 T3

fue denominado pCCL.PPT.NFκBmII,2.EGFP.PGK.CAR.WPRE (SEQ ID NO: 32) en donde el CAR fue el CAR específico de GD2. En la presente descripción, pCCL designa un vector de transferencia lentiviral que contiene LTR 5' quiméricas de CMV-HIV. En pCCL, el potenciador y el promotor de CMV se unieron a la región R del HIV-1. Las construcciones de vector denominadas pCAS son vectores retrovirales alfa que presentan LTR retrovirales alfa.

Para la transducción de partículas lentivirales, retrovirales gamma o alfa que contienen el vector, fueron aisladas células T humanas primarias a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas de las capas leucocitarias. Las células T fueron activadas con anticuerpos αCD3/αCD28 antes de la transducción y después se transdujeron con las partículas virales mediante el uso de RetroNectin (disponible en TaKaRa) como un potenciador de la transducción.

Las células T humanas primarias que contenían uno de los vectores fueron cultivados en un medio RPMI conteniendo FCS (suero fetal bovino) al 10 %, P/S (penicilina-estreptomicina) al 1 % e IL-2 durante aproximadamente 11 días, seguido de la adición de células que expresan el antígeno diana, células GD2HT1080 (HT1080 GD2), o células K562 (K562 GD2), o la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, la cual se expresa GD2 de forma natural.

La figura 3A muestra los resultados analíticos para la expresión de EGFP del primer casete de expresión medido después de 24 h de cocultivo de las células T primarias que contienen uno de estos vectores sin ninguna línea celular portadora de antígeno diana adicional (sin estimulación, col. izquierda), con células HT1080 portadoras de GD2 (col. central), o con células SH-SY5Y (col. derecha). En el ejemplo de eGFP como efector reportero, estos resultados muestran que el efector del primer casete de expresión esencialmente solo es expresado por las células T primarias en la presencia de células que portan el antígeno diana (GD2) para el CAR, mientras que en la ausencia de células que portan el antígeno diana, esencialmente no se produce expresión del efector a partir del primer casete de expresión, lo que aclara la inducción estricta y específica de CAR de la molécula efectora.

La figura 3B, de izquierda a derecha, muestra los resultados analíticos para la expresión de IL-12 humana a partir del primer casete de expresión medido después de 24 h de cocultivo de las células T primarias que contienen uno de estos vectores tanto sin ninguna línea celular portadora de antígeno diana adicional (sin estimulación, 1^{ra} col.), con células SH-SY5Y (2^{da} col.), con células HT1080 GD2 (3^{ra} col.), o con células K562 que expresan GD2 (4^{ta} col.).

Además, estos resultados muestran que en las células T primarias que fueron usadas como células inmunitarias ilustrativas, el CAR es expresado suficientemente como para activar el primer promotor del primer casete de expresión en la presencia de células que portan su antígeno diana.

La figura 3B representa además los resultados de las células T primarias que no contenían el vector para comparación (no transducidas), lo que muestra que la síntesis del efector es causada por la presencia del vector en las células inmunitarias y que no hay efectos secundarios adicionales o secreción inespecífica de citocinas en células T primarias.

Para la producción de partículas lentivirales que contienen el vector, el vector fue clonado para la transcripción bajo el control del promotor de RSV o el promotor de CMV. Las partículas virales fueron producidas en células 293T con el vector bajo el control del promotor de CMV o el promotor de RSV y conteniendo plásmidos auxiliares que codifican proteínas de recubrimiento del pseudotipo VSVg.

ES 2 986 154 T3

La figura 4A muestra los resultados de la determinación del título de partículas virales en células HT1080, mostrando los vectores, de izquierda a derecha,

5 NFATenhSyn.EGFP.PGK.CAR.wPRE,
NFATmIL2.EGFP.PGK.CAR.wPRE,
NFATenhSyn.humanIL12.PGK.CAR.wPRE (que contiene la secuencia que codifica IL12 en el primer casete de expresión), y
NFATmIL2.humanIL12.PGK.CAR.wPRE son producidos con un título significativamente más alto bajo el control del promotor de CMV para la transcripción en células de producción que bajo el control del promotor
10 de RSV.

La expresión del efector, representado por la IL-18 humana, fue evaluado en células T primarias transducidas con uno de los vectores pCCL.PPT.NFATmIL2.humanIL18.PGK.CAR.PRE conteniendo una secuencia que codifica IL-18 humana bajo el control del promotor NF A TmIL2 de la SEQ ID NO: 2,
15 pCCL.PPT.NFATenhSyn.humanIL18.PGK.CAR.PRE (SEQ ID NO: 18) conteniendo la secuencia que codifica IL-18 humana bajo el control del promotor NFATenhSyn de la SEQ ID NO: 1, en donde el CAR era un CAR específico de GD2 y en células T que no fueron manipuladas genéticamente (no transducidas, control).

La estimulación se realizó mediante incubación conjunta de células T primarias manipuladas genéticamente o
20 células T primarias no transducidas como control en una relación de efector a diana de 10:1 de células T primarias con células diana que expresan el antígeno diana GD2, específicamente las células HT1080 que expresan GD2 (HT1080 GD3/GD2, figura 4B, col. izquierda) o células SH-SY5Y (figura 4B, col. central), o sin estimulación (sin estimulación, figura 4B, col. derecha). Estos resultados muestran que, en comparación con las células de control (no transducidas), esencialmente solo las células que contienen un vector de acuerdo con la
25 invención expresan eficazmente IL-18, y que el promotor NFATenhSyn genera una expresión significativamente mayor del efector del primer casete de expresión que el promotor NFATmIL2.

La figura 4C representa los resultados analíticos de las mediciones de lactato deshidrogenasa (LDH) como un
30 indicador de citotoxicidad de células T primarias que se transdujeron con lentivirus para contener un vector de la invención después del cocultivo con células HT1080 que no expresan GD2 (HT1080, control negativo, columnas de la izquierda), o con células HT1080 que expresan GD2 (HT1080 GD3/GD2, columnas de la derecha) en una relación diana-efector de 10:1 (células T primarias con respecto a células HT1080 o HT1080 GD3/GD2). Como un control, se usaron células T primarias sin manipulación genética (no transducidas). Los resultados muestran que en la presencia de células sin antígeno diana, y especialmente en la presencia de células que portan el
35 antígeno diana, las células inmunitarias que contienen un vector de acuerdo con la invención presentan una citotoxicidad significativamente mayor que las células T primarias sin el vector (no transducidas).

Ejemplo 2: Elementos reguladores del vector retroviral gamma

40 Para las modalidades, los elementos reguladores del vector, especialmente el segundo promotor y la disposición del primer y del segundo casetes de expresión en su debida relación entre sí, se evaluaron en la modalidad de un vector retroviral gamma.

Como una modalidad se usó la disposición del primer casete de expresión y del segundo casete de expresión de
45 tal manera que el primer y el segundo casetes de expresión se dispusieran en hebras opuestas de una construcción de ácido nucleico bicatenario con sus extremos 5' adyacentes entre sí y sus extremos 3' alejados entre sí (orientación antisentido) y los casetes de expresión se encuentran entre dos LTR SIN (SIN). El primer

ES 2 986 154 T3

casete de expresión de 5' a 3' consiste en NFATmIL2 que representa el primer promotor, dscGFP (copGFP desestabilizada) como un representativo del efector. El segundo casete de expresión de 5' a 3' consiste en el promotor de PGK, el dTomato como reportero que representa el CAR y un WPRE. Esta modalidad se muestra esquemáticamente en la figura 5A.

5

La figura 5C muestra la disposición generalmente preferida del primer casete de expresión en el 5' del segundo casete de expresión, en donde, con mayor preferencia, el primer casete de expresión está dispuesta directamente adyacente al segundo casete de expresión, en donde ambos casetes de expresión están dispuestos en una hebra de ácido nucleico, de manera que ambos casetes de expresión están dispuestas en la misma dirección de la transcripción (orientación sentido). Una señal de empaque (elemento Ψ) está dispuesta entre la LTR SIN 5' y el primer promotor del primer casete de expresión.

10

La figura 5E muestra la estructura de una modalidad del vector, en la cual el segundo casete de expresión como el segundo promotor contiene el promotor de EFS para controlar la expresión de la secuencia que codifica el CAR, en el 3' al cual es adyacente un WPRE.

15

Los vectores γ -retrovirales se transdujeron en células T primarias, las cuales después del cultivo fueron estimuladas con solución salina tamponada con fosfato (PBS, control negativo), anticuerpos activadores de células T anti-CD3 y anti-CD28 (α CD3 + α CD28), o con un anticuerpo no específico (anticuerpo irrelevante, α ID (anticuerpo antiidiotipo).

20

Las figuras 5B y 5D, 5F muestran los resultados de FACS (clasificación de células por citometría de flujo activada por fluorescencia) de la expresión de dsGFP del primer casete de expresión después de la estimulación y de dTomato que representa el CAR del segundo casete de expresión como se ha indicado. Las figuras 5B y 5D muestran que la disposición del primer casete de expresión y adyacente al mismo en el 3' el segundo casete de expresión, ambos en la misma hebra de ácido nucleico (figura 5C), después de la estimulación efectiva por anti-CD3 y anti-CD28 resulta en una mayor expresión, tanto del primer como del segundo casetes de expresión, que la disposición del primer casete de expresión en orientación antisentido y el segundo casete de expresión en hebras opuestas de una construcción de ácido nucleico bicatenario, especialmente con la dirección de la transcripción que apunta en direcciones opuestas.

25

30

Además, las figuras 5B y 5D muestran que la estimulación simulada con PBS o la estimulación con un anticuerpo antiidiotipo irrelevante (α ID) no produce expresión de dscGFP. Esto muestra que las construcciones de ácido nucleico son configuradas para expresar específicamente el efector del primer casete de expresión solo después de la activación de la célula inmunitaria por la presencia del antígeno diana del CAR. Además, estos resultados muestran que el promotor inducible como el primer promotor solo es activo después de la activación específica de la célula inmunitaria.

35

La figura 5F muestra los resultados de FACS para células T primarias transducidas con el vector de la figura 5E. Aquí, la construcción dTomato-WPRE (figura 5 C) fue intercambiada por un casete de expresión de CAR. El CAR (CAR de interés, anti-CEA (antígeno carcinoembrionario)-CAR) fue detectado mediante un anticuerpo específico marcado contra la Región Bisagra del CAR (anti-F(ab)₂ anticuerpo α IgG1-PE). La figura 5F indica que las células T transducidas con el vector no mostraron expresión de dscGFP cuando fueron estimulados con PBS, pero respondieron con la inducción de dscGFP después del cultivo con el anticuerpo activador α CD3 y el anticuerpo α CD28. Además, las células T transducidas indujeron la expresión de dscGFP después de unirse al anticuerpo α ID con uniones entrecruzadas con CAR, lo que proporciona pruebas de que la señalización mediada por CAR

40

45

ES 2 986 154 T3

activa el promotor sensible a NFAT en el vector, lo que indica que el vector también es adecuado para vectores retrovirales y para el promotor de EFS.

Ejemplo 3: Elementos reguladores del vector retroviral alfa

5

Los elementos reguladores del vector, especialmente el primer promotor y la disposición del primer y del segundo casetes de expresión en su debida relación entre sí, fueron evaluados en la modalidad de un vector retroviral alfa.

10 Las células T primarias fueron transducidas con partículas virales que contienen uno de los vectores ilustrativos transferidos al vector retroviral alfa, seguido de un cocultivo con células K562 que expresan GD2 durante 24 h (figura 6A).

15 El vector que contiene la secuencia codificante de eGFP como representativo del efector bajo el control del promotor NFATenhsyn fue denominado pCAS.NFATenhsyn.EGFP.PGK.GD2CAR.wPRE SIN, y la expresión de este vector fue analizado por FACS, mediante el uso de un anticuerpo anti-GD2CAR-PE para la detección del CAR. La figura 6A presenta los resultados de FACS sin estimulación (sin estimulación), y con estimulación (K562 GD3/GD2), y mostrando que sin estimulación y también en la presencia de estimulación, el CAR es expresado, y que solo en la presencia del
20 antígeno diana GD2 para la estimulación del efector, representado por eGFP (EGFP), es regulado positivamente.

Ejemplo 4: Modalidades del vector (primer casete de expresión)

25 Los siguientes vectores ilustrativos muestran que el vector es adecuado para su introducción en otras células inmunitarias además de las células T, por ejemplo, NK92 (figura 6 C), células NK primarias y NK T y macrófagos. La estructura modular del vector permite un ajuste a las propiedades específicas y vías de señalización de las células inmunitarias. Puede obtenerse una mejora del primer casete de expresión, por ejemplo, mediante el intercambio del promotor que controla la secuencia codificante del módulo efector. Se descubrió que el intercambio del alelo del promotor de NFAT por el elemento promotor del potenciador de la cadena ligera kappa
30 del factor nuclear de células B activadas (NFκBenhsyn) (SEQ ID NO: 3) resultó en un incremento de la inducción del efector mediada por CAR, por ejemplo, representado por eGFP, en células NK92 (figura 6B y C) y células NK primarias.

35 La figura 6B muestra esquemáticamente construcciones de vectores ilustrativas que en una hebra de ácido nucleico entre una LTR 5' y una LTR SIN 3' de 5' a 3' contienen un primer casete de expresión que consiste en un primer promotor, el cual tiene la SEQ ID NO: 3 (NFκBenhsyn) o los nucleótidos 4178 .. 4281 de la SEQ ID NO: 32 (NFκBmII,2) cada uno incluye una caja TATA y una secuencia codificante para el efector el cual es representado por eGFP (EGFP) o una citocina (Citocina), y un segundo casete de expresión que consiste en un segundo promotor constitutivo, en la presente descripción el promotor de PGK que posee la secuencia de
40 nucleótidos núm. 5158..5673 de la SEQ ID NO: 8, una secuencia codificante para un CAR de interés y el WPRE que tiene la SEQ ID NO: 15 (wPRE).

45 La figura 6C muestra la comparación entre los diferentes elementos promotores evaluados (NFATenhsyn y NFκBenhsyn, respectivamente) en el primer casete de expresión en células NK92 transducidas retroviralmente alfa (pCAS.NFATenhsyn.EGFP.PGK.CAR.PRE SIN (SEQ ID NO: 26), en donde el CAR era un CAR específico de GD2, o pCAS.NFκBenhsyn.EGFP.PGK. CAR.PRE SIN (SEQ ID NO: 28). Los resultados de FACS se representaron para pCAS.NFATenhsyn.EGFP.PGK. CAR.PRE SIN en los dos gráficos de la izquierda, y para

ES 2 986 154 T3

pCAS.NFkBensyn.EGFP.PGK.CAR.PRE SIN en los dos gráficos de la derecha. Los resultados muestran que el CAR es expresada en todas las modalidades del vector analizadas, y que en la ausencia de estimulación (sin estimulación) esencialmente no se produce ningún efector (EGFP), mientras que en la presencia del antígeno diana estimulante, representado por las células de neuroblastoma SH-SY5Y que expresan GD2, se produce el efector representativo eGFP. Esto muestra que el promotor NFkBensyn como el primer promotor resulta en una expresión más fuerte y más prominente del efector codificado por el primer casete de expresión. El intercambio del elemento inducible por NFAT por el elemento inducible por NFkB resultó en una regulación positiva mejor y prominente de eGFP en células NK92, lo que indica la transducción de señales adaptada y mejorada en estas células debido al vector de acuerdo con la invención. Un vector lentiviral que contiene los casetes de expresión NFkBensyn.EGFP.PGK.CAR se muestra en la SEQ ID NO: 24.

Ejemplo 5: Modalidades del vector que expresa hIL21 o hTRAIL

Modalidades ilustrativas del vector, que en el primer casete de expresión codifica la interleucina 21 humana (hIL21) o el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral humano (hTRAIL) bajo el control de un promotor inducible por CAR, con un segundo casete de expresión que se dispone en el 3' y en orientación sentido y directamente adyacente al primer casete de expresión. El segundo casete de expresión codifica un CAR que presenta un dominio de unión que es específico para G_{D2} antígeno tumoral de células de glioblastoma. Como generalmente es preferido, también estas construcciones de ácido nucleico carecen de una señal de poliadenilación entre el primer casete de expresión y el segundo casete de expresión. La figura 7A muestra esquemáticamente la disposición de elementos de las construcciones de ácido nucleico de 5' a 3', en donde la secuencia codificante para la molécula efectora hTRAIL es representada debajo de la secuencia codificante para hIL21, lo que indica, esquemáticamente, que la secuencia que codifica hTRAIL es insertado en el mismo lugar que la secuencia que codifica hIL21 entre el primer promotor y el segundo casete de expresión. Estas construcciones de ácido nucleico contienen LTR flanqueantes, una LTR SIN 5' y una LTR SIN 3'. El segundo casete de expresión contiene el promotor de PGK, el cual controla la expresión constitutiva de CAR específico de G_{D2} (G_{D2}CAR). La secuencia de ácido nucleico del vector lentiviral que codifica hIL21 se denomina pCCL.PPT.NFATenhsyn.humanIL21co.PGK.CAR.PRE, la secuencia de ácido nucleico es proporcionado en la SEQ ID NO: 34, la secuencia de ácido nucleico del vector lentiviral que codifica hTRAIL, es denominada pCCL.PPT.NFATenhsyn.TRAIL.PGK.CAR.PRE, la secuencia de ácido nucleico es proporcionada en la SEQ ID NO: 35.

Las células T primarias humanas fueron transducidas por separado con uno de los vectores mostrados en la figura 7A, y las células T transducidas se cultivaron conjuntamente con o sin células de glioblastoma humano que expresan G_{D2} que fueron obtenidas de un paciente y se cultivaron. Después de dos días de cocultivo de las células de glioblastoma con las células T que se transdujeron con el vector que codifica hIL21, o de cultivo de las células T transducidas solas, se determinó IL21 mediante ELISA. Por el contrario, las células T cultivadas sin células de glioblastoma o las células T transducidas con un vector que carecía de G_{D2}-CAR pero que contenía solo el primer casete de expresión que codifica hIL21 cultivado en presencia o en ausencia de células de glioblastoma que se usaron como controles negativos, las células T que contienen el vector de acuerdo con la invención expresan hIL21 solo en presencia de células de glioblastoma. Los resultados se muestran en la figura 7B, en donde n.d. indica que hIL21 no era detectable en los controles, lo que indica que hIL21 estaba por debajo de los niveles de detección.

Para las células T que fueron transducidas con el vector que codifica hTRAIL, como molécula efectora, se analizó TRAIL intracelular mediante ELISA a partir de células recolectadas después de 2 días, 6 días y después de 9 días de cocultivo con células de glioblastoma. Como controles negativos, se cultivaron las células T no

ES 2 986 154 T3

transducidas (simuladas) solas y las células T solas (es decir, sin cocultivo de glioblastoma) transducidas con el vector de acuerdo con la invención tanto con el primer (hTRAIL) como con el segundo (GD₂-CAR) casetes de expresión. Los resultados de ELISA a partir de los lisados celulares muestran que solamente las células T transducidas con el vector de acuerdo con la invención con el primer y el segundo casetes de expresión produjeron hTRAIL, y solo en presencia de células de glioblastoma. La expresión de la molécula efectora ilustrativa hTRAIL aumentó significativamente durante el tiempo del cultivo, específicamente en el día 2, 10 pg/ml, en el día 6, 84,7 pg/ml, en el día 9, 212,8 pg/ml. Los resultados son representados en la figura 7C, en donde n.d. indica que hTRAIL no fue detectable en los controles, lo que indica que hTRAIL estaba por debajo de los niveles de detección.

5
10

Ejemplo 6: Células inmunitarias que contienen el vector

Mediante el uso de EGFP como representativo de una molécula efectora bajo el control del primer promotor y un segundo casete de expresión que expresa un GD₂-CAR en una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención, se transdujeron células NK-92 y se cocultivaron con células de glioblastoma derivadas de paciente que expresan el antígeno diana GD₂ y como un control sin estas células estimulantes. En una modalidad, el vector NFATsyn.EGFP-GD2CAR como el primer promotor contiene el promotor Nasty, en otra modalidad, el vector NFATmIL2.EGFP-GD2CAR contiene el promotor NFATmIL2 y en una modalidad adicional el vector NFkBsyn.EGFP-GD2CAR contiene el promotor NFkBsyn como el primer promotor. Estas construcciones contienen el promotor de PGK como el segundo promotor para expresar constitutivamente el CAR, y en el 3' con respecto al segundo casete de expresión, el cual se dispuso en orientación sentido, en el 3' con respecto al primer casete de expresión, contiene un wPRE y en el 5' con respecto al primer casete de expresión contiene una señal de empaque, un RRE y un PPT, la construcción flanqueada por LTR SIN y, a excepción de los primeros promotores diferentes, estas construcciones de ácido nucleico fueron idénticas.

15
20
25

Los resultados son representados en la figura 8, en donde la figura 8A muestra un gráfico de barras de un resumen del análisis de citometría de flujo de células NK-92 no clasificadas NFATsyn.EGFP-GD2CAR- y modificadas con NFATmIL2.EGFP-GD2CAR-(MOI 10) después de 24 h de duración del cocultivo con diferentes células diana. Las células NK-92 positivas para GD2CAR fueron detectadas mediante tinción con anticuerpos de la región scFv-CAR. Los cocultivos fueron realizados en una relación efector:diana de 10:1 (E:T; células NK-92:células de glioblastoma). Solo se detectó una ligera expresión de EGFP conducido por NFAT después del reconocimiento del antígeno; (valores medios \pm DE; n = 3, réplicas biológicas).

30

La figura 8B muestra un gráfico de barras de un resumen del análisis de citometría de flujo de la regulación positiva de EGFP en células NK-92 no clasificadas positivas para NFkBsyn.EGFP-GD2CAR-(MOI 10) después del cocultivo con diferentes células diana en una relación efector:diana 10:1 (E:T) durante 24 h. Las células NK-92 positivas para GD2CAR fueron identificadas mediante tinción con anticuerpos de la región scFv-CAR. Se detectó una expresión prominente de EGFP dependiente del reconocimiento de GD2 de las células diana en el cocultivo; (valores medios \pm DE; n=5). En las figuras 8A y 8B, las columnas de izquierda a derecha son sin estimulación (sin), con estimulación por HT1080 (HT1080, comparación negativa), con estimulación por HT1080 que expresa GD2 (HT1080 GD2, positivo) y estimulación por SH-SY5Y.

35
40

La figura 8C muestra un gráfico de barras de un resumen de los análisis de citometría de flujo de un cocultivo con células NK primarias modificadas y células diana en suspensión positivas para GD2 y negativas para GD2 después de 24 h. Se cocultivaron células NK primarias transducidas (multiplicidad de infección (MOI) 10) y no clasificadas de tres donantes diferentes con células diana en una relación efector diana (T:E) de 10:1. Las células NK primarias positivas para GD2CAR se identificaron mediante tinción con anticuerpos contra CD56 y

45

ES 2 986 154 T3

contra la región CAR del fragmento variable de cadena única (scFv). Como una comparación negativa se usó KG-1 α , para estimulación de KG1 α que expresa GD2 (KG1 α GD2). Se detectó una expresión clara e inducible de EGFP conducida por NF κ B después del reconocimiento del antígeno.

5 La figura 8D muestra análisis de citometría de flujo (FACS) ilustrativo de un cocultivo de 24 h de duración de células NK-92 modificadas clasificadas con y sin células de glioblastoma primario derivadas de paciente. Se observó una regulación positiva específica de EGFP después del reconocimiento del tumor. El gráfico de barras de la figura 8E muestra una comparación de la regulación positiva de EGFP conducida por NF κ B después de 24 h y 48 h.

10

Estos resultados muestran que las células inmunitarias que contienen el vector en la presencia de células que portan el antígeno diana del CAR producen específicamente la molécula efectora que está codificada por el primer casete de expresión. Además, estos resultados muestran que en las células inmunitarias que contienen el vector, el promotor NF κ Bsyn como el primer promotor puede estar contenido para generar una expresión más fuerte de la molécula efectora, y el promotor NFATenhsyn como el primer promotor puede estar contenido para generar una expresión más débil de la molécula efectora. Además, los resultados muestran que la elección del promotor en el primer casete de expresión puede mejorar la expresión del gen inducible de interés y es dependiente de la célula inmunitaria.

15

20

ES 2 986 154 T3

REIVINDICACIONES

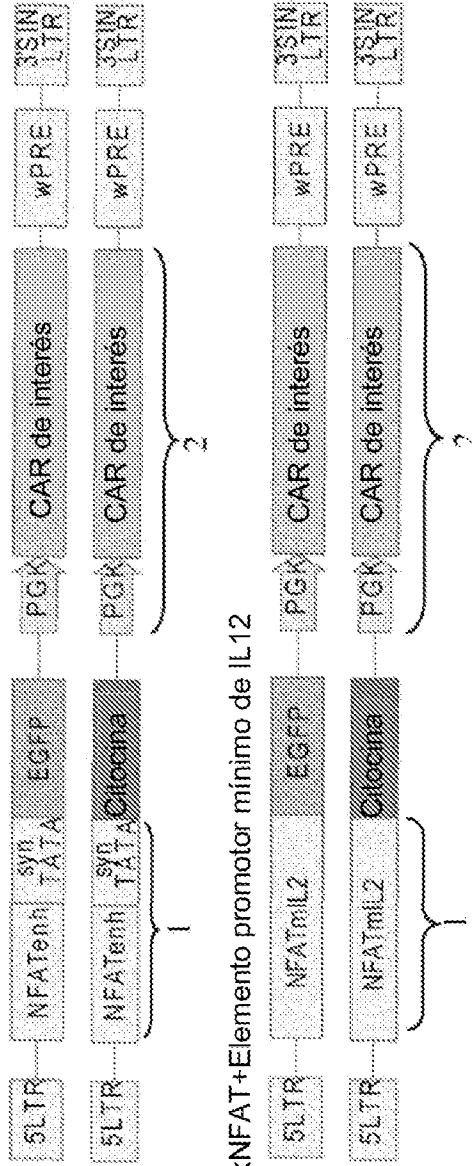
1. Construcción de ácido nucleico para la expresión de una molécula efectora en respuesta a la presencia de un antígeno diana de un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR),
5 caracterizada porque la construcción de ácido nucleico en una hebra comprende un primer casete de expresión, que comprende un primer promotor el cual es inducible mediante la unión de un CAR o TCR a su antígeno diana para controlar la expresión de una secuencia codificante para la molécula efectora, y un segundo casete de expresión que codifica el CAR o TCR bajo el control de un segundo promotor constitutivo, en donde la construcción de ácido nucleico es parte de un vector lentiviral, de un vector
10 retroviral alfa (α) o de un vector retroviral gamma (γ), y en donde el primer casete de expresión está dispuesto en el 5' del segundo casete de expresión, en donde entre el primer casete de expresión y el segundo casete de expresión no hay señal de poliadenilación y en donde una señal de poliadenilación está contenida en una LTR que está dispuesto en el 3' del segundo casete de expresión.
- 15 2. Construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el primer promotor está seleccionado de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, y la SEQ ID NO: 31.
- 20 3. Construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el segundo promotor constitutivo es seleccionado de un promotor de PGK que presenta la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos núm. 5158..5673 de la SEQ ID NO: 8, un promotor de EF-1 alfa que posee la SEQ ID NO: 11, y un promotor de SFFV que presenta la SEQ ID NO: 10.
- 25 4. Construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque en el extremo 3' de la secuencia que codifica el CAR está dispuesto un WPRE.
5. Construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la construcción de ácido nucleico solo contiene una señal de poliadenilación, que está contenida en una LTR que está dispuesta en el 3' del segundo casete de expresión.
30
6. Construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque en el 5' del primer casete de expresión está dispuesta una señal de empaque viral.
- 35 7. Construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el primer casete de expresión codifica la molécula efectora mediante la SEQ ID NO: 4 o mediante la SEQ ID NO: 6.
8. Construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde la disposición del primer casete de expresión y del segundo casete de expresión está dispuesta entre una
40 LTR 5' y una LTR SIN 3'.
9. Construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada porque los elementos LTR y LTR SIN son de origen lentiviral, de retroviral alfa o de retroviral gamma.
- 45 10. Construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque para la expresión en una célula de producción, la construcción de ácido nucleico está bajo el

ES 2 986 154 T3

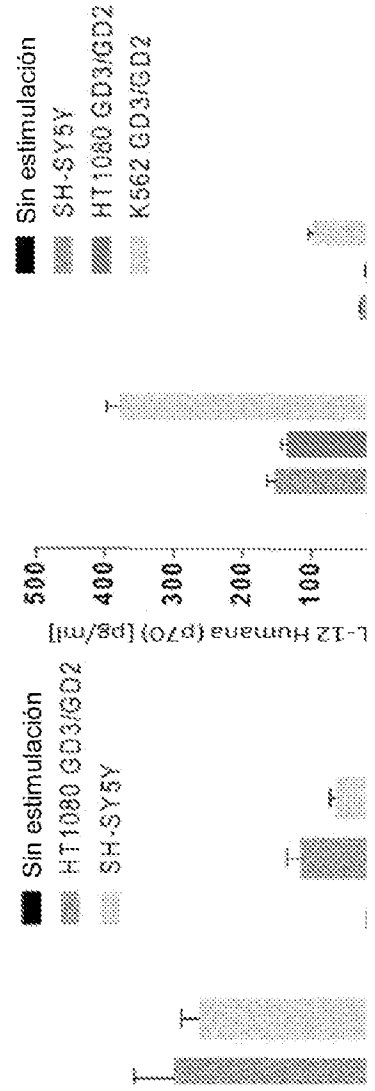
control de un promotor fuerte para conducir la transcripción del ARNm viral genómico empaquetable, por ejemplo, seleccionado del promotor de CMV, promotor de RSV o promotores derivados de HIV y MLV.

- 5 11. Construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde la construcción de ácido nucleico está contenida en una partícula viral.
- 10 12. Construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el dominio efector intracitoplasmático del CAR es el dominio efector intracelular de DAP 12 o DAP 10 o el dominio efector intracitoplasmático del CAR comprende el dominio CD3ζ, y en cada caso, opcionalmente, un dominio CD28 o 4-1BB adyacente.
- 15 13. Célula inmunitaria, que contiene una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores para usar en el tratamiento de células que expresan o presentan el antígeno diana del CAR o TCR.
- 20 14. Célula inmunitaria de acuerdo con la reivindicación 13 para usar en el tratamiento de células las cuales son células infectadas por virus o células tumorales, en donde el CAR es específico para un antígeno diana el cual es seleccionado de antígenos virales y antígenos tumorales, en donde la célula inmunitaria es una célula T CD8+ (citotóxica), una célula NK primaria o una célula T NK, una célula NK92, un macrófago o una célula dendrítica.
- 25 15. Célula inmunitaria de acuerdo con la reivindicación 13 para usar en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o para usar en la inducción de tolerancia para un antígeno diana, en donde el CAR es específico para el antígeno diana en donde la célula inmunitaria es una célula T reguladora CD4+CD25+FOXP3+ o un tipo de célula inmunomoduladora alternativa, por ejemplo seleccionada de células NK, macrófagos, células T reguladoras doblemente negativas y una célula del estroma mesenquimatoso.
- 30 16. Proceso in vitro para producir una célula inmunitaria que comprende las etapas de proporcionar una célula inmunitaria e introducir una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12 en la célula inmunitaria.
- 35 17. Proceso in vitro de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la célula inmunitaria se origina de un paciente, la construcción de ácido nucleico es introducida en la célula inmunitaria in vitro, para producir una célula inmunitaria para usar en el tratamiento de células que expresan o presentan el antígeno diana del CAR o TCR en el paciente.
- 40 18. Proceso in vitro para producir partículas virales que contienen una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende expresar la construcción de ácido nucleico en una célula de mamífero y coexpresar las proteínas estructurales virales y las enzimas de replicación (gag-pol), y la proteína de la envoltura retroviral (env), y opcionalmente una proteína rev.

Elemento promotor NFATenh



B



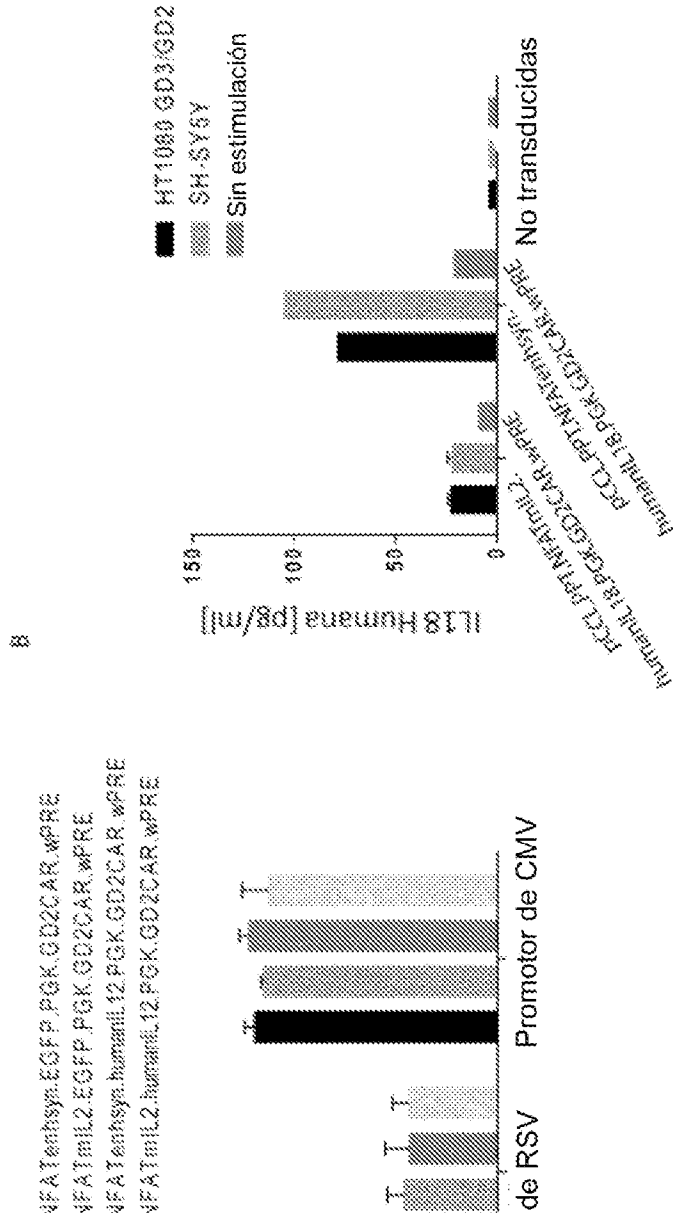
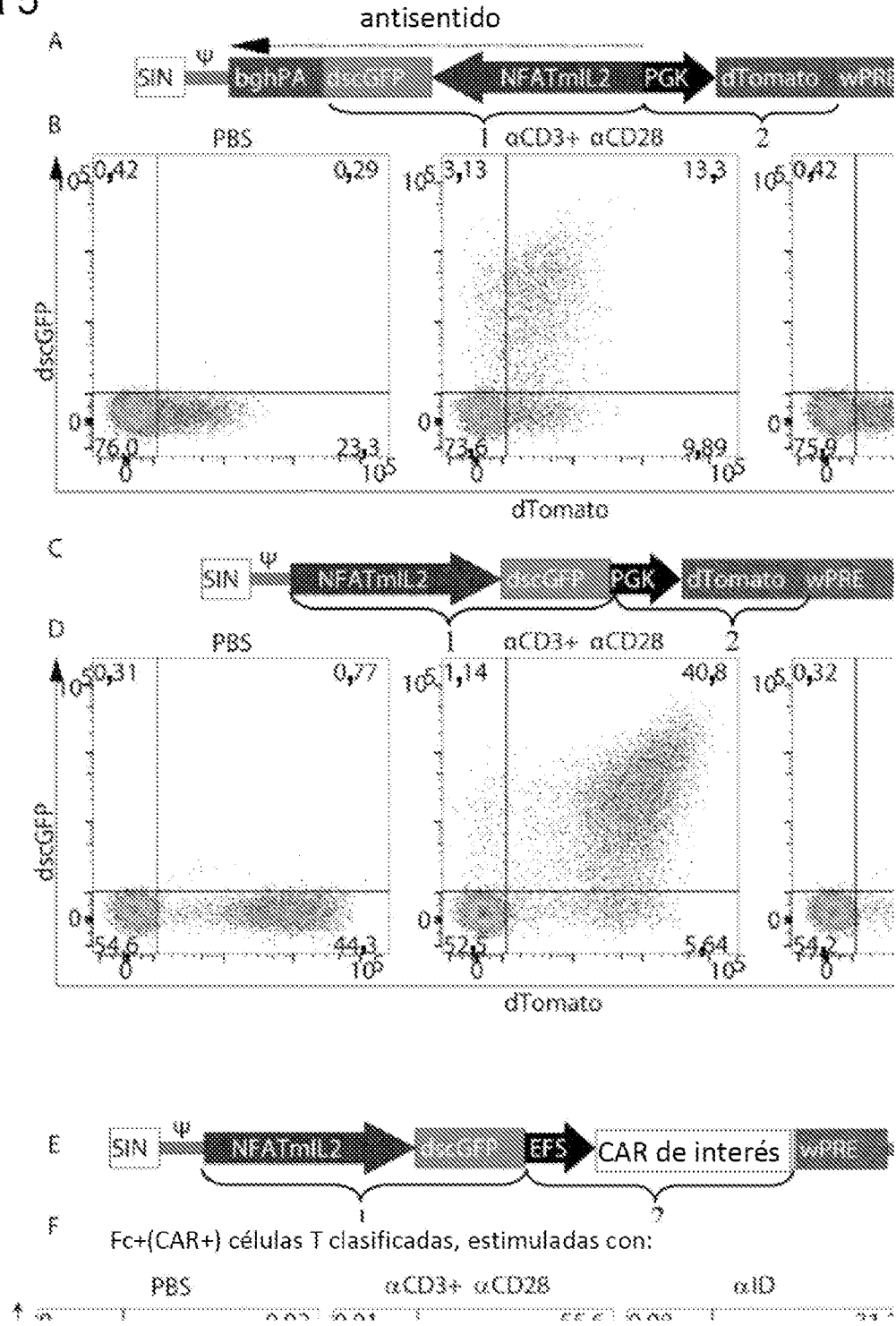
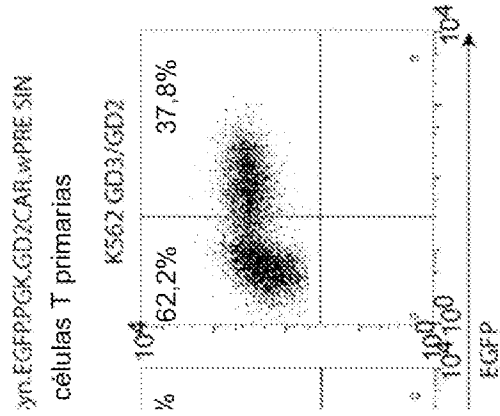


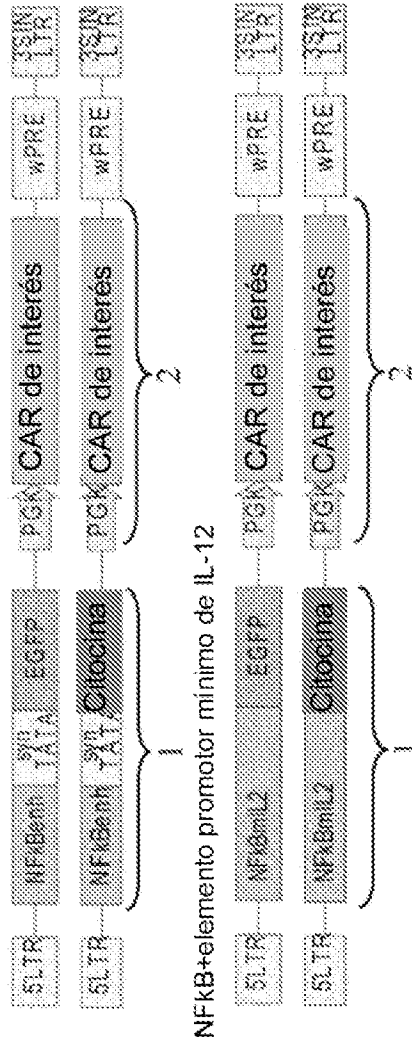
Figura 5



B



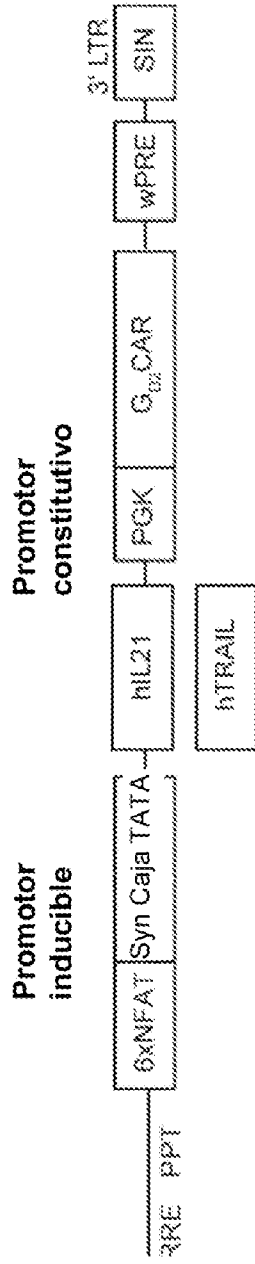
Elemento promotor NFkBenhSyn



pCAS.NFkBenhSyn.EGFP.PGK.GD2.CAR.wPRE.SIN vs. pCAS.NFkBenhSyn.EGFP.PGK.GD2.CAR.wPRE.SIN

Transducción de células NK92

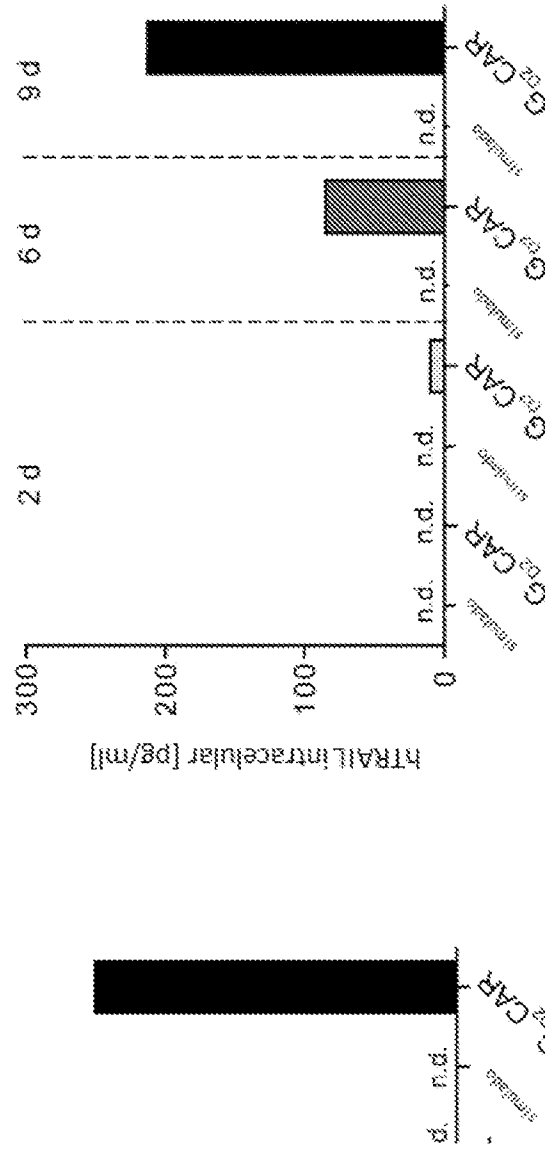




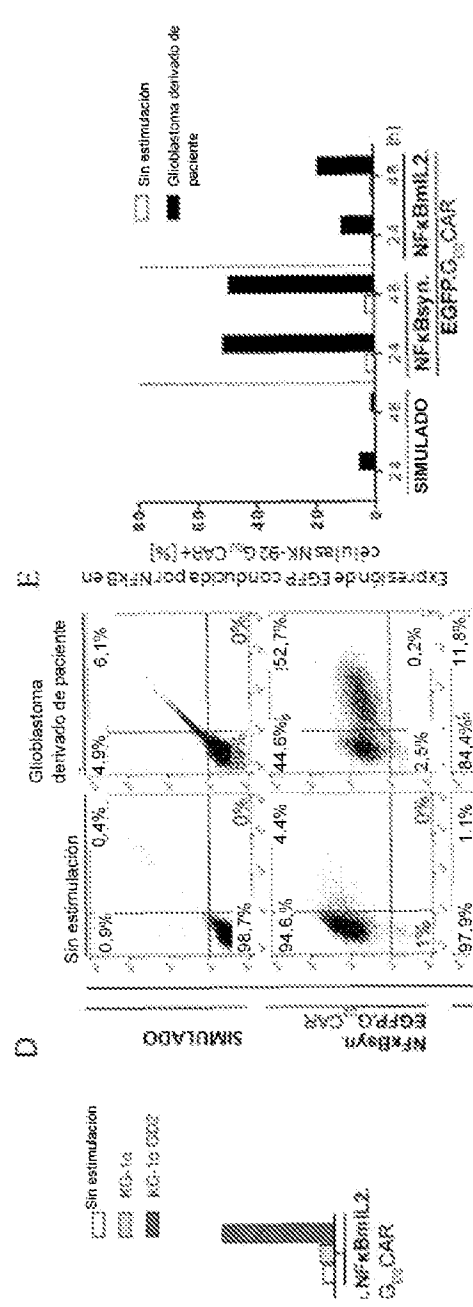
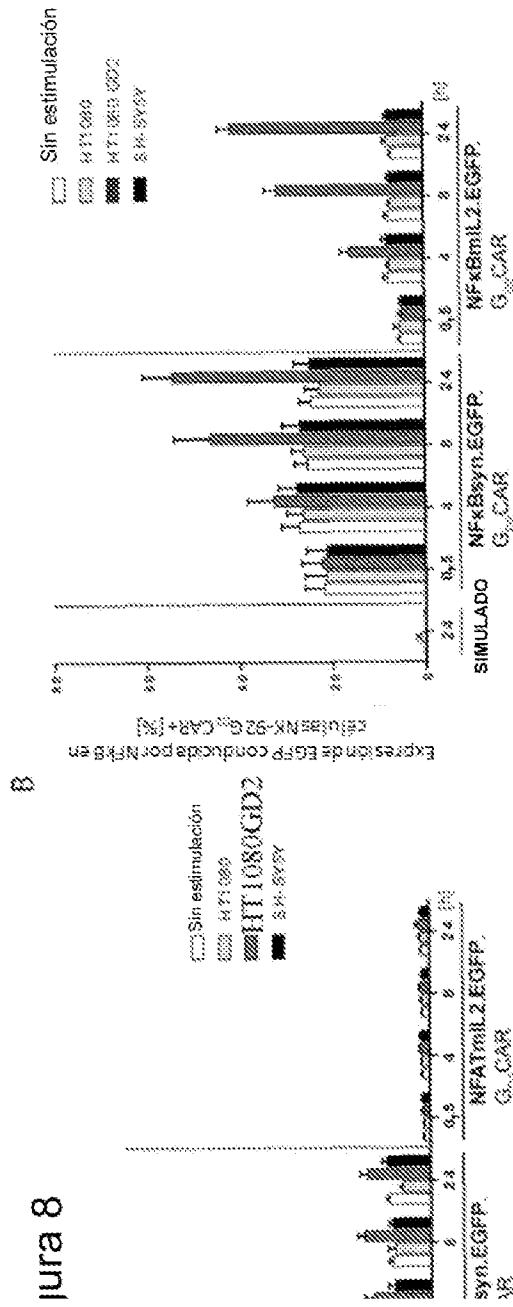
C

hIL21

hTRAIL



Jura 8



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2019051424 A2 [0005]
- WO 2018132494 A1 [0006]
- WO 2019006488 A1 [0007]
- US 20190112380 A1 [0008]
- WO 2017186121 A1 [0009]
- EP 2020067380 W [0026]

Bibliografía no especificada en la descripción de la patente

- KAILAYANGIRI et al. *Oncoimmunology*, 2017, vol. 6 (1), e1250050 [0004]
- KAILAYANGIRI et al. *Oncoimmunology*, 2017 [0033]